



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 39/21, C12N 15/48, C07K 16/10	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/25377 (43) Date de publication internationale: 27 mai 1999 (27.05.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02447 (22) Date de dépôt international: 17 novembre 1998 (17.11.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/14387 17 novembre 1997 (17.11.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): HIP-POCAMPE [FR/FR]; 50/52, avenue du Chanoine Cartellier, F-69230 Saint-Genis-Laval (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SERRES, Pierre-François [FR/FR]; 1, impasse Pierre Mollon, F-69230 Saint-Genis-Laval (FR). GEOURJON, Christophe [FR/FR]; 15, rue du Bâtonnier Jacquier, F-69007 Lyon (FR). DELEAGE, Gilbert [FR/FR]; 33, rue Saint Nestor, F-69008 Lyon (FR). COMBET, Christophe [FR/FR]; 46A, rue Montesquieu, F-42100 Saint-Etienne (FR). (74) Mandataire: TONNELIER, Jean-Claude; Nony & Associés, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(54) Title: METHOD FOR OBTAINING VACCINES FOR PREVENTING THE PATHOGENIC EFFECTS RELATED TO A RETRO-VIRAL INFECTION		
(54) Titre: OBTENTION DE VACCINS DESTINES A PREVENIR LES EFFETS PATHOGENES ASSOCIES A UNE INFECTION RETROVIRALE.		
(57) Abstract		
<p>The invention concerns a method for obtaining a vaccine against the pathogenic effects related to infection of a host by a retrovirus, in the event that the target cells of the retrovirus have a membrane receptor for a protein of the host and the viral infection induces an immune response directed both against an envelope protein of the virus and against a protein of the host. The method consists in preparing a vaccine agent based on a polypeptide comprising a fragment of an immunodominant and preserved zone of the retrovirus envelope protein, in a modified form such that the vaccine agent induces an immune response directed against the envelope protein and not against the host protein.</p>		
(57) Abrégé		
<p>Pour obtenir un vaccin contre les effets pathogènes associés à l'infection d'un hôte par un rétrovirus, dans le cas où les cellules cibles du rétrovirus possèdent un récepteur membranaire pour une protéine de l'hôte et où l'infection virale induit une réponse immunitaire dirigée à la fois contre une protéine d'enveloppe du virus et contre une protéine de l'hôte, on prépare un agent vaccinal à base d'un polypeptide comprenant un fragment d'une zone immunodominante et conservée de la protéine d'enveloppe du rétrovirus, sous une forme modifiée telle que l'agent vaccinal induit une réponse immunitaire dirigée contre la protéine d'enveloppe et non contre la protéine de l'hôte.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Obtention de vaccins destinés à prévenir les effets
pathogènes associés à une infection rétrovirale

La présente invention concerne un procédé pour obtenir des
5 vaccins destinés à prévenir les effets pathogènes associés, chez
les humains ou chez les animaux vertébrés, à des infections
rétrovirales.

Les effets pathogènes associés à une infection rétrovirale
sont les effets néfastes, incluant d'éventuels effets oncogènes ou
10 immunosuppresseurs, induits par l'introduction d'un rétrovirus
dans l'organisme d'un hôte (mammifère, oiseau ou encore poisson),
suivie de la pénétration et de la réplication dudit rétrovirus
dans des cellules de l'hôte qui sont des cellules cibles du
rétrovirus, c'est-à-dire des cellules dans lesquelles le virus est
15 capable de pénétrer.

Les rétrovirus sont ainsi nommés parce qu'ils ont la
capacité, grâce à l'enzyme appelée transcriptase inverse,
d'effectuer une transcription d'ARN en ADN, alors que chez les
êtres vivants l'information génétique va habituellement de l'ADN
20 des chromosomes aux protéines, par l'intermédiaire de l'ARN
messager.

Dans la famille des rétrovirus, on distingue trois sous-
familles : les oncovirus, les lentivirus et les spumavirus.

Les oncovirus sont des rétrovirus ainsi nommés car ils
25 peuvent être associés à des cancers et des infections malignes. On
peut citer par exemple les virus leucémogènes (tels que le virus
de la leucémie aviaire (ALV), le virus de la leucémie murine
(MULV), encore nommé virus de Moloney, le virus de la leucémie
féline (FELV), des virus de la leucémie humaine tels que HTLV1 et
30 HTLV2, le virus de la leucémie simienne ou STLV, le virus de la
leucémie bovine ou BLV), les oncovirus de type D des primates, les
oncovirus de type B inducteurs de tumeurs mammaires, ou des
oncovirus provoquant un cancer rapide (tel que le virus du sarcome
de Rous ou RSV) ; voir par exemple STEHELIN et al., J. Mol.Biol.
35 101 : 349-365 (1976).

Les lentivirus sont ainsi nommés parce qu'ils sont
responsables de pathologies à évolution lente impliquant très
fréquemment des phénomènes immunosupresseurs, incluant des SIDAS.

-2-

Le Tableau 1 annexé indique à titre illustratif les pathologies associées à certains lentivirus, ainsi que les principales cellules cibles de ces lentivirus.

Les spumavirus manifestent assez peu de spécificité pour un type de cellule donné ou une espèce donnée, et ils sont parfois associés à des phénomènes immunosupresseurs ; c'est le cas par exemple du virus spumeux du singe (ou SFV).

L'un des buts de la présente invention est l'élaboration de procédés et produits vaccinaux visant à prévenir efficacement les effets pathogènes, y compris les effets oncogènes ou immunosupresseurs, associés à l'infection d'un organisme-hôte par un rétrovirus.

L'immunosuppression associée à l'infection a été constatée pour un très grand nombre de rétrovirus, et peut être considérée comme une constante pathogène de l'infection rétrovirale ; voir notamment BENDINELLI et al., *Advances in Cancer Research* 45 : 125-181 (1985). C'est le cas notamment des infections à lentivirus. C'est également le cas dans bon nombre d'infections à oncovirus ; voir par exemple P. SONIGO dans l'ouvrage "SIDA et infection par VIH", MONTAGNIER et al. (Médecine Science Flammarion), pages 113-122 (1989).

De nombreux vaccins humains et animaux ont été essayés pour prévenir les effets pathogènes des infections à rétrovirus mais, en règle générale, ces vaccins sont peu efficaces ou inefficaces. En particulier, dans le domaine du SIDA humain ou animal, on constate que, 14 ans après la découverte du virus HIV (BARRE-SINOSSI et al., *Science* 220 : 868-871, 1983), on n'a pas encore pu trouver un vaccin parvenant à enrayer efficacement une infection post-vaccinale HIV ou SIV ; voir par exemple LINHART et al., *AIDS Research and Human Retroviruses* 13 : 593-599 (1997) ; VOGT et al., *Vaccine* 13 : 202-208 (1995) ; et LETVIN et al., *J.Virol.* 69 : 4569-4571 (1995).

La majorité des préparations vaccinales utilisées comprennent des protéines de l'enveloppe rétrovirale sous différentes formes, par exemple, des virus inactivés, des protéines d'enveloppe comme les protéines gp 120 et gp 160 de HIV (voir notamment GORSE, G.J., *Vaccine* 10 : 383-388, 1992), des cores de virus avec des protéines d'enveloppe, ou des protéines d'enveloppe associées à différents

-3-

vecteurs (virus chimères, bactéries) ; voir Levy J.A., Trans.Med.Rev. 2 : 265-271, 1988 et Microbiol.Rev.57 : 183-289, 1993, en particulier page 247.

5 D'autres préparations utilisent des fragments de l'enveloppe rétrovirale ou des peptides immunodominants issus des glycoprotéines d'enveloppe, ces peptides étant présentés sous différentes formes (lipopeptides, peptides liés à une protéine support), de façon à les rendre immunogènes ; voir notamment Eriksson et al., Vaccine, 11 : 859-865 (1993).

10 Les stratégies vaccinales classiquement décrites, par exemple dans le domaine du SIDA humain, simien ou félin, préconisent de ne pas modifier les épitopes conservés et immunodominants des protéines d'enveloppe, ce qui peut sembler tout à fait logique. En effet, d'une part, ces épitopes conservés sont communs à
15 différentes souches virales, ce qui est favorable à l'élaboration d'un vaccin qui doit induire une réponse immunitaire dirigée contre une majorité de souches. D'autre part, ces épitopes immunodominants sont bien reconnus par le système immunitaire, cellulaire ou humoral, lors du processus vaccinal et infectieux
20 et, de surcroît, ils représentent fréquemment des sites de neutralisation ; voir par exemple HO et al., J.Virol. 61 : 2024-2028 (1987) ; JOHNSON et al., J.Exp.Med 175 : 961-971 (1992) ; SHAFFERMAN et al., P.N.A.S. U.S.A. 88 : 7126-7130 (1991) ; et HAMMOND et al., J.Immunol. 146 : 1470-1477 (1991).

25 Le procédé de l'invention consiste, au contraire, à modifier des épitopes conservés et immunodominants de certaines protéines de l'enveloppe virale, afin d'aboutir à un vaccin efficace.

En effet, les auteurs de la présente invention ont découvert que des zones conservées et immunodominantes de l'enveloppe
30 rétrovirale peuvent être à l'origine de phénomènes auto-immuns nuisibles. A titre d'exemple, dans le cas du SIDA humain, ils ont observé que certaines zones conservées et immunodominantes de l'enveloppe du VIH présentent des analogies de structure tridimensionnelle et/ou des réactions croisées avec certaines
35 zones d'au moins une protéine du système immunitaire humain, de sorte que l'administration comme vaccin d'une protéine virale contenant lesdites zones intactes induit une réponse immunitaire

qui est à l'origine de réactions auto-immunes néfastes conduisant à l'échec vaccinal.

A l'origine de la présente invention, on trouve, d'une part, l'observation mentionnée précédemment que des zones conservées et immunodominantes de certains rétrovirus, présentes habituellement dans des préparations vaccinales, sont précisément, dans bon nombre de cas, des zones qui provoquent des réactions auto-immunes néfastes parce qu'elles présentent des analogies de structure tridimensionnelle et/ou des réactions croisées avec certaines protéines de l'hôte du virus. A l'origine de la présente invention, on trouve aussi, d'autre part, l'observation que lesdites protéines de l'hôte utilisent la même cellule cible, ou les mêmes cellules cibles, que lesdits rétrovirus. L'ensemble de ces observations effectuées par les auteurs de l'invention les ont conduit à penser que les protéines d'enveloppes rétrovirales et les protéines de l'hôte qui présentent des analogies de structure tridimensionnelle et/ou des réactions croisées se fixent dans de nombreux cas sur les mêmes cellules cibles et possèdent, sur ces cellules cibles, des récepteurs membranaires communs.

On dit qu'une protéine présente une réaction croisée avec une autre protéine lorsqu'il est possible d'obtenir, par immunisation *in vivo* ou *in vitro* à l'aide de l'une desdites protéines, une réponse immunitaire dirigée aussi contre l'autre protéine, par exemple lorsque cette immunisation induit une réponse humorale (dite de type B) et permet d'obtenir et de sélectionner au moins un anticorps monoclonal qui est capable de reconnaître l'autre protéine, ou lorsqu'une même réponse immunitaire cellulaire (c'est-à-dire de type T) induite *in vitro* par l'une des protéines reconnaît les deux protéines, selon les tests connus de mise en évidence d'une réponse immunitaire de type T, tels que par exemple les tests de cytotoxicité *in vitro*. On sait que le terme "immunisation" désigne le processus d'induction d'une réponse immunitaire consécutive à la stimulation, par mise en contact *in vivo* ou *in vitro*, de cellules immunocompétentes d'un hôte avec un antigène, et que l'un des buts de l'administration d'un agent vaccinal est justement d'obtenir une telle immunisation.

L'invention a donc pour objet un procédé d'obtention d'un vaccin contre les effets pathogènes associés à l'infection d'un

hôte, animal ou humain, par un rétrovirus capable de pénétrer dans une cellule cible dudit hôte, ladite cellule cible possédant un récepteur membranaire pour une protéine dudit hôte, procédé dans lequel on prépare un agent vaccinal à base d'un polypeptide
5 comprenant au moins une partie d'une protéine d'enveloppe d'une souche pathogène dudit rétrovirus, et dans lequel ledit polypeptide est préparé sous une forme modifiée, étant entendu que :

- 10 - ladite partie de la protéine d'enveloppe est choisie parmi celles qui comprennent au moins un fragment d'une zone immunodominante de ladite protéine d'enveloppe, ledit fragment contenant au moins un acide aminé qui est un acide aminé conservé de ladite zone immunodominante et qui est présent dans ladite souche pathogène,
- 15 - ledit polypeptide, à l'état non modifié, induit une réponse immunitaire dirigée à la fois contre ladite zone immunodominante et contre la protéine de l'hôte,
- et ledit polypeptide modifié est choisi par ceux qui induisent une réponse immunitaire dirigée contre ladite
20 zone immunodominante de la protéine d'enveloppe et non contre la protéine de l'hôte.

Dans la définition du procédé de l'invention qui vient d'être donnée, l'agent vaccinal est dit "à base" d'un polypeptide modifié. Cela signifie que l'agent vaccinal comprend un tel
25 polypeptide modifié, mais cela ne signifie pas que l'agent vaccinal est nécessairement de nature exclusivement polypeptidique. En fait, dans cet agent vaccinal, ledit polypeptide peut, éventuellement, être lié (notamment de façon covalente) ou associé, de façon connue en soi, à toute molécule
30 biocompatible qui peut être choisie, par exemple, parmi les polymères, les lipides, les peptides (y compris des lipopeptides, des glycopeptides, des protéines), les acides nucléiques, les oligosaccharides, etc. Ladite molécule biocompatible peut notamment servir de support à l'agent immunogène polypeptidique.
35 Elle peut aussi servir à modifier la conformation du polypeptide et, dans ce dernier cas, ladite molécule doit être considérée comme un substituant modifiant le résidu d'acide aminé auquel il est attaché, ledit substituant modifiant ainsi, en définitive,

l'antigénicité du polypeptide dont ce résidu d'acide aminé fait partie.

Le procédé de l'invention peut comprendre, au moins dans une phase préliminaire de recherche, une étape consistant à
5 sélectionner des polypeptides (non modifiés) comprenant au moins une partie, telle que définie ci-dessus, de la protéine d'enveloppe virale d'une souche pathogène du rétrovirus. Cette partie de protéine, qui comprend au moins un fragment immunogène d'une zone immunodominante, est telle que le polypeptide (non
10 modifié) est capable d'induire une réponse immunitaire dirigée à la fois contre la protéine virale (plus précisément contre le fragment de la zone immunodominante contenu dans ladite partie) et contre la protéine de l'hôte, et c'est l'existence d'une telle réponse immunitaire, dirigée contre la protéine d'enveloppe virale
15 et contre la protéine de l'hôte, qui définit, dans la présente demande, le caractère pathogène d'une souche virale. On peut ainsi sélectionner les polypeptides (non modifiés) comprenant un tel fragment.

Un fragment polypeptidique est dit immunogène si
20 l'immunisation d'un hôte, *in vivo* ou *in vitro*, avec ledit fragment, éventuellement lié à un support approprié (tel qu'une protéine, un lipide ou un polypeptide), permet d'obtenir une réponse immunitaire, de type B et/ou de type T, dirigée contre ledit fragment polypeptidique.

25 Dans la présente demande, lorsqu'on parle d'une réponse immunitaire, sans autres précisions, il s'agit d'une réponse immunitaire d'un vertébré, consécutive à une immunisation *in vitro* ou *in vivo*.

Le procédé de l'invention peut aussi comprendre au moins une
30 étape consistant à modifier, de la façon qui sera indiquée ci-après, un polypeptide ainsi sélectionné, et à choisir, parmi les polypeptides ainsi modifiés, au moins un polypeptide modifié qui induit une réponse immunitaire dirigée contre la protéine d'enveloppe virale et non contre la protéine de l'hôte.

35 Ainsi, alors que l'art antérieur enseignait, comme noté ci-dessus, de ne pas modifier les épitopes conservés et immunodominants des protéines d'enveloppes rétrovirales, le procédé de l'invention a pour but, au contraire, de modifier

-7-

l'antigénicité de tels épitopes de façon à obtenir une réponse immunitaire différenciée vis-à-vis de la protéine d'enveloppe virale et d'une protéine de l'hôte.

On sait que pour modifier l'antigénicité d'un fragment immunogène d'un polypeptide, il est possible de modifier ledit polypeptide à l'aide d'une mutation portant sur au moins un acide aminé. On définira plus loin ce qu'il faut entendre ici par "mutation". L'acide aminé muté peut être situé dans le fragment immunogène, ou même dans une zone du polypeptide extérieure audit fragment. On sait en effet que la modification d'un acide aminé situé à l'extérieur d'un fragment peut affecter la structure spatiale dudit fragment, et donc son antigénicité ; en particulier, il a été montré que la conformation d'un résidu d'acide aminé, dans un peptide, peut être influencée par la nature des résidus d'acides aminés à des positions allant de +8 à -8 par rapport à ce résidu d'acide aminé ; voir par exemple GARNIER et al., J.Mol.Biol. 120 : 97-120 (1978). Au-delà, la nature des résidus d'acides aminés a encore une influence, mais cette influence n'est ni systématique ni quantifiable à partir de la seule connaissance de la séquence peptidique considérée.

Un acide aminé muté peut donc être situé, dans le polypeptide modifié, à l'intérieur ou à l'extérieur du fragment immunogène. Lorsqu'il est à l'extérieur du fragment immunogène, il n'est généralement pas séparé de l'extrémité la plus proche dudit fragment immunogène, dans la chaîne polypeptidique, par plus de huit (et notamment par plus de sept) résidus d'acides aminés. En particulier, un acide aminé, muté conformément à la présente invention, et situé à l'extérieur du fragment immunogène, n'est généralement pas séparé par plus de huit résidus d'acides aminés, et en particulier par plus de sept résidus d'acides aminés, de l'acide aminé conservé le plus proche appartenant à la zone immunodominante dont au moins un fragment est contenu dans le polypeptide non modifié.

Le polypeptide modifié conformément à la présente invention peut être par exemple la protéine d'enveloppe entière d'une souche virale pathogène, modifiée par au moins une mutation comme indiqué ci-dessus. Le polypeptide modifié peut être aussi une partie de la protéine d'enveloppe d'une souche virale pathogène, modifiée par

au moins une mutation comme indiqué précédemment, ladite partie comprenant au moins un fragment immunogène tel que défini précédemment. Le polypeptide modifié peut être également une protéine chimère comprenant au moins une partie de la protéine d'enveloppe, ladite partie de la protéine d'enveloppe étant
5 définie comme précédemment et comportant au moins une mutation.

Le polypeptide modifié utilisé selon l'invention peut être par exemple une glycoprotéine transmembranaire d'un rétrovirus ou un fragment d'une glycoprotéine transmembranaire, en particulier
10 un fragment comprenant une zone externe de ladite glycoprotéine transmembranaire (modifiée), c'est-à-dire une zone qui se trouve sur la face extérieure de la membrane virale. Bien entendu, un tel fragment de protéine comprend au moins une partie d'une zone immunodominante, comme indiqué ci-dessus. Lorsqu'on fait référence
15 à une zone "externe" d'une protéine, il s'agit plus précisément de sa surface accessible au solvant qui peut être définie notamment à l'aide de logiciels tels que X-plor (voir ci-après) utilisant l'algorithme décrit par Lee & Richards, J. Mol. Biol 55 : 379-400, 1971. Ledit polypeptide peut aussi être sous la forme d'un
20 oligomère d'au moins une partie de ladite glycoprotéine transmembranaire, à l'état modifié.

La définition donnée ci-dessus du procédé de l'invention implique que le polypeptide utilisé comprenne au moins une partie d'une zone immunodominante et conservée d'une protéine d'enveloppe virale. Dans la description de la présente demande, on appelle
25 "zone conservée" une zone, éventuellement réduite à un seul résidu d'acide aminé, de la protéine virale, où l'on retrouve, pour une majorité de souches d'un virus donné (par exemple dans au moins 6 souches sur 10 environ), un ou plusieurs acides aminés identiques
30 ou fonctionnellement analogues situés à la même position dans des alignements de séquences peptidiques de ladite protéine des diverses souches. Un tel acide aminé identique ou fonctionnellement analogue est appelé acide aminé conservé. La notion de conservation d'acides aminés fonctionnellement analogues
35 est connue, et il existe de nombreuses matrices de substitutions permettant de quantifier cette notion (Dayhoff, M.O. et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure, 1978, Vol 5, Suppl 3, Chapitres 22 et 23).

Les zones conservées peuvent être facilement déterminées, après séquençage de protéines de diverses souches du virus étudié, par les méthodes d'alignements multiples des séquences obtenues. On peut utiliser pour cela par exemple le programme Clustal-w
5 (Thompson J.D. et al., Nucleic Acids Research 22 : 4673 - 4680, 1994). Par ailleurs, les séquences de protéines de diverses souches virales sont souvent accessibles sur des bases de données. Par exemple, le serveur Web de la base de données HIV de Los Alamos présente les séquences HIV1, HIV2, SIV et FIV, remises à
10 jour régulièrement. L'adresse de ce serveur sur le réseau Internet est :

<http://hiv-web.lanl.gov/HTML/sequences.html>

Les tableaux 2a, 2b, 2c et 2d annexés sont des exemples d'alignement de séquence des régions appartenant aux
15 glycoprotéines d'enveloppes homologues de la région 545-682 de la glycoprotéine transmembranaire de HIV1 (entrée SWISSPROT ENV_HV1 BR), respectivement pour HIV1, HIV2, FIV et SIV. La dernière ligne des tableaux résume, à l'aide de symboles, le degré d'homologie, et donc le degré de conservation, observé. Le symbole "*" indique
20 une position de l'alignement où le même résidu est présent dans toutes les séquences, le symbole ":" indique une position dans l'alignement où les acides aminés présents dans les différentes séquences sont très similaires, le symbole "." indique une
25 position dans l'alignement où les acides aminés présents dans les différentes séquences sont similaires, et l'absence de symbole indique une position dans l'alignement où les acides aminés présents dans les différentes séquences sont peu similaires. Cette symbolique est utilisée par le programme d'alignement Clustal W (version 1.7).

30 Dans la description de la présente demande, on appelle zone immunodominante d'une protéine une séquence peptidique qui induit dans une grande majorité des cas (par exemple dans au moins 7 cas sur 10 environ) une réponse humorale et/ou cellulaire du système immunitaire dirigée contre ladite zone après immunisation avec une
35 protéine contenant ladite séquence ou avec un peptide constitué essentiellement par ladite séquence.

La définition du procédé de l'invention fait référence aux cellules cibles d'un virus qui sont les cellules à l'intérieur

-10-

desquelles le virus est capable de pénétrer. Les cellules cibles des rétrovirus sont généralement connues. Les virus ont la propriété de se fixer sur les cellules qu'ils sont susceptibles d'infecter. On peut donc éventuellement rechercher par des expériences de routine *in vitro* les cellules cibles d'un virus étudié.

La définition du procédé de l'invention fait aussi référence aux cellules de l'hôte ayant un récepteur membranaire pour une protéine de l'hôte. Les cellules de l'hôte ayant un récepteur pour une protéine dudit hôte sont souvent connues et, dans le cas contraire, il est possible, par des expériences de routine, de déterminer si une protéine donnée se fixe sur un certain type de cellules. On peut par exemple utiliser une protéine radiomarkée et déterminer si elle se fixe sur ledit type de cellule. On peut également rechercher si la protéine se fixe sur un récepteur membranaire donné en utilisant une lignée cellulaire transfectée par un gène exprimant ledit récepteur membranaire.

Les protéines de l'hôte pour lesquelles certaines cellules de l'hôte possèdent un récepteur membranaire sont principalement des protéines appartenant à l'ensemble des médiateurs protéiques solubles. Cet ensemble inclut des protéines appelées, selon les cas, hormones, facteurs de croissance ou cytokines, bien qu'il n'y ait pas de frontières tranchées entre ces diverses catégories de médiateurs ; voir par exemple CAVAILLON J.M., Les Cytokines (Masson, Paris, 1996) chapitre 1, pages 1-3 et préface.

Dans la présente demande, on considère qu'une réponse immunitaire, par exemple une réponse anticorps, obtenue par immunisation à l'aide du polypeptide modifié préparé conformément au procédé de l'invention, est dirigée contre la protéine d'enveloppe virale et non contre la protéine de l'hôte, lorsque les anticorps obtenus ont des affinités pour la protéine de l'hôte et pour la protéine d'enveloppe du rétrovirus qui présentent une différence importante, se traduisant notamment par des différences de réactivité considérées comme très significatives dans des tests ELISA, telles que par exemple des densités optiques dans un rapport d'environ 4 (ou davantage), ce qui signifie que la densité optique observée après fixation desdits anticorps sur la protéine virale est au moins quatre fois plus élevée que celle observée

-11-

pour la fixation desdits anticorps sur la protéine de l'hôte. De façon analogue, une réponse immunitaire de type cellulaire est considérée comme dirigée contre la protéine d'enveloppe mais non contre la protéine de l'hôte lorsque l'immunisation *in vitro* de

5 cellules immunocompétentes de l'hôte avec le candidat vaccin induit la formation de cellules activées dont la réaction vis-à-vis de cellules (incluant des lignées cellulaires transfectées) exprimant la protéine d'enveloppe rétrovirale est significativement plus élevée que la réaction vis-à-vis de

10 cellules exprimant la protéine de l'hôte, par exemple lorsque, dans la mesure optique finale, ou dans le comptage final de radioactivité (notamment radioactivité de ^{51}Cr relargué par des cellules cibles) du test mis en œuvre, ou encore dans l'appréciation par tous moyens connus d'une lyse cellulaire causée

15 par des cellules cytotoxiques induites, les échelles de réponse sont dans un rapport d'environ 4 (ou davantage). Les critères qui viennent d'être indiqués permettent au moins de faire un premier choix parmi les peptides modifiés étudiés, mais en définitive c'est l'absence ou la diminution de l'effet pathogène dû à la

20 suppression ou à l'affaiblissement (mis en évidence par tout moyen approprié) de la réponse immunitaire vis-à-vis de la protéine de l'hôte, qui constituera le critère de sélection des peptides modifiés susceptibles de constituer des agents vaccinaux satisfaisants.

25 Les zones immunodominantes et conservées dont on souhaite modifier l'antigénicité, conformément à l'invention, peuvent être choisies parmi celles qui donnent *in vitro* une réaction croisée, de type B et/ou de type T, avec la protéine de l'hôte définie précédemment.

30 On peut aussi choisir une telle zone immunodominante et conservée parmi celles pour lesquelles on a déterminé préalablement une analogie de structure tridimensionnelle avec une zone de ladite protéine de l'hôte, ladite analogie de structure étant susceptible d'être associée à une réaction croisée *in vitro*

35 et/ou *in vivo*. L'analogie de structure tridimensionnelle entre certaines zones de deux protéines fait référence à des dispositions équivalentes, dans l'espace, de résidus d'acides aminés qui sont similaires en raison notamment de leur chaîne

-12-

latérale et/ou de leurs groupements chimiques fonctionnels analogues. Les structures tridimensionnelles des protéines peuvent être obtenues à l'aide de spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) et/ou de spectres de diffraction des rayons X. Par exemple, la structure de la protéine gp41 de SIV a été obtenue à l'aide du spectre RMN (Caffrey M. et al., J. Mol.Biol. 271, 819-826, 1997). En outre, il est possible, dans certains cas, d'obtenir un bon modèle à l'aide de techniques de modélisation moléculaire, à partir des coordonnées atomiques d'une protéine de structure connue. On peut utiliser pour cela, notamment, le logiciel de modélisation moléculaire X-plor (référence : "A system for X-ray crystallography and NMR, Version 3.1", Axel T. Brunger, Yale University Press, 1992).

Pour rechercher une analogie de structure tridimensionnelle, on peut faire appel par exemple aux méthodes connues de visualisation et de superposition sur écran graphique de la structure tridimensionnelle de molécules biologiques. Il existe des logiciels qui permettent la visualisation des structures tridimensionnelles des molécules avec différents modes de représentation, le calcul de paramètres géométriques (tels que distances, angles, etc) et la superposition objective et quantitative de plusieurs structures moléculaires (notamment logiciels RASMOL : Sayle, R.A. et Milner-White E.J., J. Mol.Biol., 247, 536-540, 1995 et ANTHERPROT : Geourjon C. et Deléage G., J.Mol.Graph.13, 209-212, 1995) ainsi que l'estimation de l'accessibilité aux solvants (logiciels X-plor, déjà mentionné, et CCP4 : Collaborative Computational Project Number 4, Acta Cryst., D50, 760-763, 1994).

Cependant, afin d'avoir une estimation plus fine de ces analogies structurales, il est utile de considérer, au niveau de chaque acide aminé, les groupements fonctionnels positionnés de manière analogue dans les deux protéines que l'on compare. Pour cela, les co-inventeurs de la présente invention utilisent des méthodes permettant de calculer des surfaces moléculaires dans le but de comparer des propriétés fonctionnelles entre deux structures tridimensionnelles, pour tenir compte non pas des acides aminés dans leur globalité, mais aussi, plus spécialement, des groupements chimiques fonctionnels de chacun d'entre eux (par

exemple : fonctions amide, carboxylique, hydroxyle, sulfhydryle, amine, etc.). On peut ainsi prendre en considération, dans les structures comparées, des acides aminés fonctionnellement analogues, et non pas seulement des acides aminés identiques.

5 On considère donc qu'une zone d'une protéine rétrovirale présente une analogie de structure tridimensionnelle avec une zone donnée d'une protéine de l'hôte, lorsque les techniques qui viennent d'être mentionnées permettent de mettre en évidence, dans les deux zones comparées, une organisation spatiale similaire de
10 certains acides aminés identiques ou fonctionnellement analogues.

Il est à noter que les acides aminés fonctionnellement analogues et regroupés de façon similaire dans l'espace peuvent être relativement éloignés les uns des autres dans une même chaîne peptidique. Mais l'analogie de structure tridimensionnelle, entre
15 deux protéines que l'on compare, peut aussi concerner la disposition dans l'espace, de façon similaire, d'acides aminés identiques ou fonctionnellement analogues dans le cas où, l'une des protéines étant oligomérisée, les résidus d'acides aminés impliqués sont situés sur des chaînes différentes de l'oligomère,
20 tandis que les résidus d'acides aminés de l'autre protéine qui sont impliqués dans cette analogie peuvent être situés sur une même chaîne peptidique de cette autre protéine.

Il est particulièrement avisé de rechercher des analogies de structure tridimensionnelle et/ou des réactions croisées avec des
25 zones de la protéine de l'hôte impliquées dans la fixation de ladite protéine sur son récepteur.

Parmi les protéines de l'hôte dont il est fait mention dans la définition du procédé de l'invention, on citera en particulier les médiateurs solubles tels que définis ci-dessus. Compte tenu de
30 la remarque, faite précédemment, que des effets immunosupresseurs sont généralement associés aux infections rétrovirales, il est particulièrement important de rechercher des analogies de structure et/ou des réactions croisées entre une protéine externe d'un rétrovirus et des médiateurs protéiques solubles du système
35 immunitaire. Parmi ces médiateurs du système immunitaire, on citera les cytokines, et notamment l'interleukine-2, l'interleukine-10, l'interleukine-15, ainsi que l'interleukine-8 et les chemokines.

-14-

Pour préparer le polypeptide modifié qui constitue l'agent vaccinal obtenu selon l'invention, on peut utiliser les méthodes connues de synthèse peptidique ou les méthodes du génie génétique. On peut isoler ou préparer une séquence polynucléotidique codant pour au moins une partie de la protéine d'enveloppe du virus et, si désiré, on peut introduire à ce stade, dans la séquence nucléotidique, les mutations permettant d'obtenir un produit de traduction muté qui constitue le polypeptide modifié. On peut également synthétiser directement une séquence polynucléotidique modifiée comportant une ou plusieurs mutations et codant pour le polypeptide modifié. Les séquences polynucléotidiques mutées ainsi obtenues sont introduites de façon connue dans un vecteur approprié permettant d'exprimer ledit polypeptide, éventuellement sous forme modifiée. Un tel vecteur est par exemple E. coli, un baculovirus, ou une cellule de mammifère. On peut aussi effectuer la mutation sur un polypeptide non modifié obtenu selon l'une des méthodes précédentes.

Dans la présente demande, on appelle "mutation" toute modification d'une région (éventuellement réduite à un seul résidu d'acide aminé) d'un polypeptide, par des moyens physiques, des moyens chimiques (modification covalente ou non covalente) et/ou biologiques (mutations par substitution, délétion et/ou insertion d'un ou plusieurs acides aminés), conduisant à la modification des potentialités fonctionnelles du ou des acides aminés constitutifs de ladite région, dite "région mutée". A titre d'exemple, on peut effectuer des modifications conduisant à l'abolition, l'acquisition et/ou la modulation des propriétés de ponts disulfure, de liaisons hydrogène, d'interactions électrostatiques et/ou d'interactions hydrophobes, la modification de la capacité d'une protéine à former un hétéro-complexe, ou encore, dans le cas d'une protéine oligomère, la modification de l'état d'oligomérisation ou de la stabilité de l'oligomère.

La modification d'un acide aminé a d'une chaîne polypeptidique (y compris la modification d'un acide aminé terminal du polypeptide considéré) peut influencer la conformation des acides aminés voisins dans la chaîne, y compris, comme on l'a rappelé ci-dessus, la conformation d'un acide aminé b séparé de a par un nombre de résidus d'acides aminés pouvant aller jusqu'à

-15-

sept ou huit, et lorsque l'acide aminé b fait partie d'un épitope, toute modification de l'acide aminé a (notamment toute addition d'un substituant ou toute modification d'un substituant) est susceptible de modifier l'antigénicité de l'épitope considéré.

5 Dans la phase de recherche de polypeptides modifiés conformément à l'invention, le choix des acides aminés à muter et/ou le choix des méthodes de mutation peut être fait de façon arbitraire ou de façon raisonnée. On peut utiliser notamment l'une au moins des méthodes de modification suivante :

- 10 1) le remplacement d'un ou plusieurs acides aminés ayant une chaîne latérale hydrophobe (Exemples : Ala, Leu, Val, Ile, Phe, Trp, Met, Tyr, Cys) par un ou plusieurs acides aminés ayant une chaîne latérale hydrophile (Exemples : Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Thr, His, Lys) ou indifférente
15 (Exemples : Gly, Pro) et vice versa ;
- 2) le remplacement d'un ou plusieurs acides aminés ayant une chaîne latérale positivement chargée (Exemples : Arg, Lys, His) par un ou plusieurs acides aminés ayant une chaîne latérale négativement chargée (Exemples : Asp, Glu) ou
20 neutre et vice versa ;
- 3) l'acquisition, la suppression et/ou la modification d'un ou plusieurs ponts disulfure ;
- 4) la réalisation de mimotopes, en particulier obtenus par *retro inverso* ;
- 25 5) les substitutions, suppressions, additions et/ou autres modifications d'au moins un acide aminé potentiellement donneur ou accepteur de liaisons hydrogène ;
- 6) les substitutions, suppressions, additions et/ou autres modifications d'au moins un acide aminé potentiellement
30 donneur ou accepteur de liaisons ioniques ;
- 7) le changement de l'encombrement stérique par substitutions, suppressions, additions et/ou autres modifications d'un ou plusieurs acides aminés ;
- 8) l'utilisation d'acides aminés non naturellement présents
35 dans les protéines ;
- 9) la modification de la glycosylation (création, suppression ou modification de sites de glycosylation ou de leurs sucres associés).

Bien entendu, les polypeptides modifiés ainsi obtenus sont testés, comme indiqué ci-dessus, afin de sélectionner les polypeptides modifiés qui induisent une réponse immunitaire dirigée contre la protéine d'enveloppe et non contre la protéine de l'hôte.

5 Le procédé de l'invention peut être appliqué à l'obtention de vaccins, notamment contre les virus suivants : HIV, FIV, SIV, oncovirus leucémogènes (virus des leucémies aviaire, murine, féline, humaine, simienne et bovine c'est-à-dire, respectivement, 10 ALV, MULV, FELV, HTLV, STLV, BLV), des rétrovirus de type D des primates, des rétrovirus de type B inducteurs des tumeurs mammaires, virus du sarcome de Rous, virus Visna-maedi (infectant le mouton), virus du sarcome des félins, virus de la myelocytomatose aviaire et virus de la myeloblastose aviaire.

15 L'invention a également pour objet l'utilisation d'un polypeptide modifié, tel que défini précédemment, dans la préparation d'une composition vaccinale destinée à prévenir les effets pathogènes associés à l'infection d'un hôte par un rétrovirus.

20 L'invention concerne également une composition vaccinale pouvant être obtenue par le procédé de l'invention, et contenant comme ingrédient actif un polypeptide modifié tel que décrit ci-dessus. Une telle composition peut être utilisée dans une méthode de vaccination destinée à prévenir les effets pathogènes des 25 infections à rétrovirus, cette méthode consistant essentiellement à administrer à un animal vertébré, y compris un humain, un polypeptide modifié tel que défini ci-dessus en quantité suffisante pour obtenir un effet de vaccination. La formulation des compositions vaccinales, et leur méthode d'administration, 30 sont connues en soi et ne seront pas décrites davantage ici.

L'invention a aussi pour objet un polynucléotide rétroviral modifié codant pour un polypeptide modifié tel que défini précédemment. Le polynucléotide modifié peut être obtenu comme 35 indiqué précédemment. L'invention s'étend à un vecteur d'expression dans lequel ledit polynucléotide modifié a été inséré, ledit vecteur d'expression étant ainsi capable d'exprimer le polypeptide modifié.

Le polypeptide modifié obtenu selon l'invention peut également servir d'agent immunogène en vue d'induire par immunisation la formation d'anticorps utilisables notamment dans le traitement des infections rétrovirales, et l'invention concerne
5 donc également des anticorps obtenus en réponse à l'immunisation d'animaux (y compris des humains), *in vivo* ou *in vitro*, à l'aide de l'agent vaccinal contenant un polypeptide modifié décrit ci-dessus. Les anticorps de l'invention sont notamment des anticorps polyclonaux purifiés ou des anticorps monoclonaux présentant la
10 caractéristique de reconnaître la protéine d'enveloppe rétrovirale sans reconnaître la protéine de l'hôte. La purification des anticorps polyclonaux, et la sélection des anticorps monoclonaux, peuvent être effectués à l'aide de la protéine virale et de la protéine de l'hôte, de façon à ne retenir que les anticorps
15 reconnaissant la protéine virale et non la protéine de l'hôte. Les anticorps de l'invention peuvent être utilisés notamment dans le traitement précoce des infections provoquées chez ledit hôte par le rétrovirus contre lequel ils sont dirigés. La posologie est la posologie usuelle des anticorps. Les compositions pharmaceutiques
20 contenant de tels anticorps constituent également l'un des objets de l'invention.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

EXEMPLE 1

On expose ci-après comment les auteurs de la présente
25 invention ont recherché des analogies structurales et antigéniques entre une protéine d'enveloppe d'un virus, à savoir la protéine gp41 de HIV 1, et une cytokine, à savoir l'interleukine-2 (en abrégé : IL-2) humaine.

On remarquera que les séquences peptidiques de gp41 et de
30 l'IL-2 humaine ne sont pas homologues. En effet, les deux protéines ne présentent globalement entre elles que 16,5% d'identité de séquence, ce seuil d'homologie n'étant pas significatif, comme on peut le constater aisément à l'aide de simulations *in silico* réalisées sur des séquences de même
35 composition mais dont l'ordre des acides aminés a été aléatoirement modifié.

Des travaux anciens (Bost et al., Immunology 65 : 611-615, 1988) avaient signalé une homologie de séquence entre la protéine

gp41 et l'IL-2 (séquence LERILL). Il faut noter que cette séquence LERILL de gp41 ne constitue pas une zone immunodominante de cette protéine ; voir LEVY J.A, Microbiol. Rev. 57 : 183-289 (1993) en particulier page 232. La séquence LERILL est d'ailleurs située à l'intérieur de la particule virale ; elle correspond à la partie C-terminale de gp41.

Ayant observé que l'IL-2 et les rétrovirus associés aux SIDA semblent avoir des cellules cibles communes, les auteurs de la présente invention ont fait l'hypothèse que le récepteur de l'interleukine-2 humaine pourrait être commun à l'IL-2 et à la protéine gp41 de HIV, et ils ont donc recherché d'éventuelles analogies structurales tridimensionnelles entre ces deux dernières.

Dans la présente demande, les numérotations des résidus d'acides aminés de la séquence peptidique de l'interleukine-2 et de gp41 sont celles utilisées dans la banque SWISSPROT (version 34).

Les séquences peptidiques de l'IL-2 et de la protéine gp41 sont connues. Dans la présente demande, on fait référence aux séquences publiées suivantes :

- pour IL-2 : entrée SWISSPROT (version 34) ayant pour code IL2__HUMAN ;
- pour gp41 : entrée SWISSPROT (version 34) ayant pour code ENV__HV1BR.

Les structures publiées qui ont été utilisées sont les suivantes :

- pour IL-2 : entrée PDB (Brookhaven Databank) 1IRL ;
- pour gp41 : entrées PDB (Brookhaven Databank)
 - 1AIK,
 - 1ENV.

Par ailleurs, la structure tridimensionnelle de l'IL-2, déterminée par RMN, est connue (Mott, P.C. et al., J. Mol.Biol., 248 : 979,1995), de même que la structure de certains domaines de la protéine gp41, qui a été obtenue à l'aide du spectre de diffraction des rayons X (Chan, D.C. et al., Cell, 89, 263-273, 1997 ; Weissenhorn, W et al., Nature, 387, 426-430, 1997). D'autre part, un modèle tridimensionnel d'une partie du domaine externe, dans la région 545-671, de la protéine gp41 (forme trimère) a été

obtenu, par modélisation moléculaire, par les co-inventeurs de la présente invention. Ce modèle moléculaire a été obtenu en utilisant le logiciel X-plor par une stratégie proche de celle de la modélisation moléculaire sous contraintes RMN. Les contraintes
5 nécessaires pour la modélisation moléculaire de la forme trimère ont été déduites de la structure tridimensionnelle du mutant pII du domaine "leucine zipper" de la protéine GCN4 (code PDB : 1GCM), cristallisé sous la forme d'un trimère de type "coiled coil".

En examinant les structures obtenues, des analogies
10 tridimensionnelles ont été trouvées entre certaines zones de la protéine gp41 et certaines zones de l'interleukine-2 participant à la fixation sur son récepteur. Le mode de fixation de l'IL-2 sur son récepteur, ainsi que les zones de l'IL-2 impliquées dans cette fixation, sont en effet connus ; voir BAZAN J.F., P.N.A.S. USA
15 : 6934-6938 (1990) ; Bamborough P. et al., Structure 2 : 839-851 (1994) ; Gnarr J., R. et al., P.N.A.S. USA 87 : 3440-3444 (1990) ; Takeshita T. et al., Science 257 : 379-382 (1992) ; et CAVAILLON J.M., Les Cytokines (Masson, Paris, 1996), pages 119-125.

Ces résultats ont été confirmés par des études de
20 comparaisons globales des structures de gp41 et de l'IL-2, et aussi par des comparaisons locales faites en s'intéressant plus spécialement aux groupements fonctionnels analogues de chacune des structures, comme déjà indiqué dans la description ci-dessus.

On a observé notamment que les régions 53-61 et 88-93 de
25 l'IL-2, organisées en hélice alpha, se superposent de façon satisfaisante avec deux des trois hélices du trimère central de gp41. Cela implique que dans les deux protéines, des groupements portés par des hélices différentes peuvent avoir des propriétés d'accessibilité et d'organisation relative comparables.

30 Il a également été trouvé des analogies structurales tridimensionnelles locales entre une région immunodominante fortement conservée de la glycoprotéine gp41 de VIH (plus précisément dans la région 545-682) et l'interleukine-2 humaine.

La séquence peptidique de la région 545-682 de la protéine
35 gp41 de HIV 1 (code SWISSPROT : ENV_HV1BR) est reproduite dans le Tableau 3 annexé.

Dans le Tableau 3bis annexé, on a représenté les séquences peptidiques de quatre zones de cette région de gp41 (555-577, 572-

601, 590-620 et 628-663), dans lesquelles on a relevé des analogies structurales et/ou des réactions croisées avec l'IL-2.

Les zones de l'IL-2 concernées par les analogies de structure qui viennent d'être mentionnées sont les zones 27-47, 45-69, 99-121 et 131-153 de l'IL-2. Les séquences peptidiques de ces zones sont représentées dans le Tableau 4 annexé.

Il est important de noter que la zone 27-47 de l'IL-2 est impliquée dans la fixation de l'IL-2 sur la chaîne bêta de son récepteur. En effet, les acides aminés dans la zone 27-47 appartiennent à l'hélice A qui participe à la fixation sur le récepteur de l'IL-2 (RIL-2), plus précisément sur bêta RIL-2.

Les acides aminés dans la zone 45-69 appartiennent à une région de l'IL-2 qui participe à la fixation sur alpha RIL-2.

Les acides aminés dans la région 99-121 appartiennent à l'hélice E participant à la fixation sur bêta RIL-2.

Les acides aminés dans la zone 131-153 de l'IL-2 appartiennent à l'hélice F participant à la fixation sur gamma RIL-2.

A titre illustratif, on précise dans le Tableau 4bis annexé les analogies des structures qui ont été trouvées entre la zone 572-601 de gp41 et la zone 27-47 de l'IL-2 humaine. Les acides aminés externes impliqués dans cette analogie de structure tridimensionnelle sont soulignés dans le Tableau 4bis.

Il faut noter cependant qu'une même zone de gp41 peut présenter des analogies de structure tridimensionnelle avec plusieurs zones distinctes de l'IL-2.

En outre, les auteurs de l'invention ont remarqué que dans la région 600-612 de gp41, les trois lysines (K) en position 606 sur les trois chaînes de trimère de gp41 sont susceptibles de former un épitope conformationnel, ces lysines de gp41 pouvant correspondre, dans l'espace, aux lysines 52, 96 et 55 de l'IL-2.

Ils ont également observé des réactivités immunologiques croisées entre les protéines gp41 et IL-2. En particulier, en utilisant les techniques ELISA et PEPSCAN, avec des anticorps provenant de sérums HIV+ purifiés par immunopurification sur une colonne contenant de l'IL-2 humaine immobilisée, ils ont constaté que certains de ces anticorps reconnaissent des zones de l'IL-2 impliquées dans la fixation de l'IL-2 sur les chaînes alpha, bêta

-21-

et gamma de son récepteur, et notamment des zones appartenant à l'hélice A (KTQLQLEHLLLTQ), l'hélice E (RPRDLISNINVIVLELK), l'hélice F (TIVEFLNRWITFCQSIISTLT), la boucle AB et le début de l'hélice B (NNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK).

5 En utilisant les techniques de dépôt ponctuel sur filtre (ou "dot") et les techniques d'immunotransfert du type western blot, il a également été montré que des anticorps polyclonaux provenant de sérums de malades HIV+, et immunopurifiés sur de l'IL-2 humaine, reconnaissent des oligomères de la protéine gp41.

10 Les études effectuées ont également montré que des anticorps monoclonaux anti-gp41 murins et humains dirigés contre des zones conservées immunodominantes de la protéine gp41 de HIV reconnaissent des zones de l'IL-2 qui participent à la fixation de cette dernière sur les chaînes alpha, bêta et gamma du récepteur
15 de l'IL-2.

On peut donc obtenir des vaccins contre le virus HIV, conformément à l'invention, notamment en préparant des polypeptides contenant au moins l'une des zones de gp41 décrites dans le Tableau 3bis, lesdits polypeptides étant sous forme
20 modifiée, c'est-à-dire contenant au moins une mutation, comme indiqué précédemment. Il faut bien comprendre que ces découpages de la région 545-682 en zones peuvent présenter un certain caractère arbitraire, et c'est pourquoi certaines zones indiquées peuvent être chevauchantes.

25 **EXEMPLE 2 = Mutations sur gp41 de HIV1**

On prépare selon les méthodes connues des glycoprotéines d'enveloppe gp41 mutées. Ces mutations sont décrites dans le Tableau 5 annexé qui représente la séquence concernée de gp41 et, alignées sous cette dernière, les séquences mutées. Le niveau des
30 mutations est signalé en soulignant les acides aminés concernés.

On prépare des compositions vaccinales comprenant chacune, en solution saline aqueuse, stérile et apyrogène, l'une des protéines gp41 mutées obtenues ci-dessus.

On immunise des lapins ou des souris avec les protéines
35 mutées obtenues, et on recherche si les anticorps développés par ces animaux reconnaissent ou ne reconnaissent pas l'interleukine-2 humaine, par exemple par la technique ELISA ou PEPSCAN. On sélectionne les protéines mutées qui induisent la formation

-22-

d'anticorps ne reconnaissant pas l'IL-2, mais reconnaissant la protéine gp41.

La technique PEPSCAN est décrite par J. WORTHINGTON et K. MORGAN, "Epitope mapping using synthetic peptides", in "PEPTIDE
5 ANTIGENS-A practical approach" (G.B. WISDOW Ed.), Oxford University Press (1994).

EXEMPLE 3 = Mutations sur gp36 de FIV

La séquence de la protéine gp36 de FIV est connue (référence ENV_FIVPE).

10 Dans le Tableau 6 annexé, on a représenté certaines séquences de cette protéine, homologues des zones conservées de gp41 décrites au Tableau 3bis, avec des exemples de mutations.

-23-

TABLEAU 1

LENTIVIRUS	HOTE	PRINCIPALE CELLULE CIBLE	
EIAV	Cheval	Macrophage	Anémie hémolytique
VISNA VIRUS	Mouton	Macrophage	Visna maedi : encéphalite-pneumonie interstitielle
CAEV	Chèvre	Macrophage	Immunodéficience - encéphalopathie - arthrite
BIV	Bovin	Lymphocyte T	Immunodéficience - lymphocytose bovine
FIV	Chat+félidés	Lymphocyte T	Immunodéficience (SIDA)
SIV	Primates (singes)	Lymphocyte T	Immunodéficience (SIDA)
HIV	Homme	Lymphocyte T	Immunodéficience (SIDA)

EIAV désigne le virus de l'anémie infectieuse équine

CAEV désigne le virus de l'encéphalite caprine

5

FIV signifie : virus de l'immunodéficience féline

SIV signifie : virus de l'immunodéficience simienne

HIV signifie : Virus de l'immunodéficience humaine.

TABLEAU 2a

[illegible]

TABLEAU 2a (suite)

	GP41_HV1Z2	LLELDKWASLWNWFNITQ
	GP41_HV1Z6	LLELDKWASLWNWFNITQ
5	GP41_HV1EL	LLELDKWASLWNWFSITQ
	GP41_HV1ND	LLELDKWASLWNWFSITK
	GP41_HV1MA	LLELDKWASLWNWFSISK
	GP41_HV1Z8	LLQLDKWASLWNWFSITK
10	GP41_HV1C4	LLQLDKWASLWTWSDITK
	GP41_HV1S1	LLELDKWASLWNWFDISK
	GP41_HV1BN	LLELDKWASLWNWFNITN
	GP41_HV1JR	LLELDKWASLWNWFGITK
	GP41_HV1J3	LLGLDKWASLWNWFTITN
	GP41_HV1SC	LLELDKWASLWNWFNITN
15	GP41_HV1KB	LLALDKWDSLWNWFSITK
	GP41_HV1Y2	LLALDKWASLWNWFDITK
	GP41_HV1MN	LLELDKWASLWNWFDITN
	GP41_HV1A2	LLELDKWASLWNWFSITN
	GP41_HV1OY	LLELDKWAGLWSWFSITN
20	GP41_HV1RH	LLELDKWANLWNWFDITQ
	GP41_HV1S3	LLELDKWASLWNWFSITN
	GP41_HV1H2	LLELDKWASLWNWFNITN
	GP41_HV1H3	LLELDKWASLWNWFNITN
	GP41_HV1B1	LLELDKWASLWNWFNITN
25	GP41_HV1PV	LLELDKWANLWNWLNITN
	GP41_HV1B8	LLELDKWASLWNWFNITN
	GP41_HV1MF	LLELDKWASLWNWFNITN
	GP41_HV1BR	LLELDKWASLWNWFNITN
	GP41_HV1W1	LLELDKWASLWNWFSITN
30	GP41_HV1W2	LLELDKWASLWNWFDITN
	GP41_HV1ZH	LLALDKWANLWNWFDISN
		** ***** .***. *::

-28-

TABLEAU 2d

	GP41_SIVMK	QSRTLLAGIVQQQQQQLLDVVKRQOELLRLTVWGTKNLQTRVTAIEKYLEDQAQLNAWGCA
	GP41_SIVML	QSRTLLAGIVQQQQQQLLDVVKRQOELLRLTVWGTKNLQTKVTAIEKYLKDQAQLNAWGCA
5	GP41_SIVM1	QSRTLLAGIVQQQQQQLLDVVKRQOELLRLTVWGTKNLQTRVSAIEKYLKDQAQLNAWGCA
	GP41_SIVS4	QSRTLLAGIVQQQQQQLLDVVKRQOELLRLTVWGAKNLQTRVTAIEKYLKDQAQLNSWGCA
	GP41_SIVSP	QSRTLLAGIVQQQQQQLLDVVKRQOELLRLTVWGAKNLQTRVTAIEKYLKDQAQLNSWGCA
	GP41_SIVAG	QSQHLLAGILQQQKNLLAAVEAQOQMLKLTIWGVKNLNARVTAIEKYLEDQAQLNSWGCA
	GP41_SIVAT	QSRHLLAGILQQQKNLLAAVEAQOQMLKLTIWGVKNLNARVTAIEKYLEDQAQLNSWGCA
10	GP41_SIVA1	QSQHLLAGILQQQKNLLAAVEAQOQMLKLTIWGVKNLNARVTAIEKYLEDQAQLNSWGCA
	GP41_SIVAI	QSRHLLAGILQQQKNLLAAVEAQOQMLKLTIWGVKNLNARVTAIEKYLEDQAQLNSWGCA
	GP41_SIVGB	QSQSLVTGIVEQQKQLLKLIEQQSELLKLTIWGVKNLQTRLTSLENYIKDQALLSQWGCS
	GP41_SIVCZ	QARQLLSGIVQQQNNLLKAIQAQOHLQLSIWGVKQLQARLLAVERYLQDQOILGLWGCS
		:: *** : * : : : : : * * * . *
15	GP41_SIVMK	FRQVCHTTVPWPNASL-----TPDWNNDTWQEWERKVDFFLEENITALLEEAIQOQEKNNMY
	GP41_SIVML	FRQVCHITVPWPNASL-----TPDWNNDTWQEWERKVDFFLEENITALLEEAIQOQEKNNMY
	GP41_SIVM1	FRQVCHTTVPWPNASL-----TPDWNNETWQEWERKVDFFLEANITALLEEAIQOQEKNNMY
	GP41_SIVS4	FRQVCHTTVPWPNETL-----VPNWNMTWQEWERQVDFLEANITQLEEEAIQOQEKNNMY
20	GP41_SIVSP	FRQVCHTTVPRPNDTL-----TPNWNMTWQEWERQVDFLEANITQLEEEAIQOQEKNNMY
	GP41_SIVAG	WKQVCHTTVPWQWNNR-----TPDWNMTWLEWERQISYLEGNITTQLEEARAQEEKNLD
	GP41_SIVAT	WKQVCHTTVEWPWTNR-----TPDWQNMWLEWERQIADLESNITGQLVKAREQEEKNLD
	GP41_SIVA1	WKQVCHTTVPWTWNN-----TPEWNNMTWLEWERQIEGLEGNITQLEEQAREQEEKNLD
	GP41_SIVAI	WKQVCHTTVPWKYNN-----TPKWDNMTWLEWERQINALEGNITQLEEEAQNQESKNLD
25	GP41_SIVGB	WAQVCHTSVEWTNTSI-----TPNWTSETWKEWETRTDYLOQNITEMLKQAYDREQRNTY
	GP41_SIVCZ	GKAVCYTTVPWNNNSWPGSNSTDDIWNGLTWQQWDKLVSNYTGKIFGLLEEAQSQQEKNER
		**:: : * : : * * * : : * * * : : * * * : : *
30	GP41_SIVMK	ELQKLNSWDVFGNWFDLAS
	GP41_SIVML	KLQKLNSWDVFGNWFDLAS
	GP41_SIVM1	ELQKLNSWDVFGNWFDLTS
	GP41_SIVS4	ELQKLNSWDIFGNWFDLTS
	GP41_SIVSP	ELQKLNSWDIFGNWFDLTS
	GP41_SIVAG	AYQKLSSWSDFWSWFDFSK
35	GP41_SIVAT	AYQKLTSWSDFWSWFDFSK
	GP41_SIVA1	AYQKLSDWSSFWSWFDFSK
	GP41_SIVAI	LYQKLDDWSGFWSWFSLST
	GP41_SIVGB	ELQKLGDLTSWASWFDFTW
	GP41_SIVCZ	DLELDQWASLWNWFDITK
40		: * . . . *

-29-

TABLEAU 3

gp41 (région 545-682)

5 545 - QARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIK
 QLQARILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVP
 WNASWSNKSLEQIWNNMTWMEWDREINNYTSLIHS
 LIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITN - 682

TABLEAU 3bis

10 Zones de gp41
 Zone 555-577 QQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWG
 Zone 572-601 QLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIW
 Zone 590-620 RYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWS
 Zone 628-663 WNNMTWMEWDREINNYTSLIHS
 15 LIEESQNQQEKNEQ

TABLEAU 4

IL-2
Zone 27-47 TKKTQLQLEHLLLDLQMI ^{NG}
Zone 45-69 LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK
Zone 99-121 HLRPRDLISNINVIVLELKGSET
Zone 131-153 TATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

TABLEAU 4Bis

gp41	IL-2
Zone 572-601 QLTVWGIKQLQARIL <u>LA</u> VERYLK <u>DQ</u> QLLGIW	Zone 27-47 TKKTQLQLEHLLLDLQMI ^{NG}

-30-

TABLEAU 5**Mutations au niveau de la zone 555-577**

5

Zone 555-577 QQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWG

Mutation 1 : QQQNNLLAAIEAQQHLLQLTVWGMutation 2 : QQQNNLLRAIERRQQHLLQLTVWG10 Mutation 3 : QQQNNLLAAIERQQHLLQLTVWGMutation 4 : QQQNNLLRAIEAQQELLQLTVWGMutation 5 : QQQNNLLRAIEAQQLLQLTVWGMutation 6 : QQQNNLLRAIEAQQHLLRLTWVGMutation 7 : QQQNNLLRAIEAQQHLLKLTWVG15 Mutation 8 : QQQNNLLRAIEAQQLLKLTWVG**Mutations au niveau de la zone 572-601**Zone 572-601 QLTWVGIKQLQARILAVERYLDQQLGIW

20

Mutation 1 : QLTWVGIKQLQARILAVERYLDQQLGIWMutation 2 : QLTWVGIKQLQARILAVEAYLDQQLGIWMutation 3 : QLTWVGIKQLQARILAVEAYLDQQLGIWMutation 4 : QLTWVGIKQLQARILAVEDYLDQQLGIW25 Mutation 5 : QLTWVGIKQLQARITAVERYLDQQLGIW

TABLEAU 5 (suite)**Mutations au niveau de la zone 590-620**

5	Zone 590-620	RYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWS
	<u>Mutation 1</u> :	<u>K</u> YLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWS
	<u>Mutation 2</u> :	RYLKDQ <u>A</u> LLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWS
	<u>Mutation 3</u> :	RYLKDQ <u>Q</u> QLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWS
	<u>Mutation 4</u> :	RYLKDQ <u>AQ</u> LGIWGCSGKLICTTAVPWNASWS
10	<u>Mutation 5</u> :	RYLKDQ <u>AR</u> LGIWGCSGKLICTTAVPWNASWS
	<u>Mutation 6</u> :	RYLKDQQLL <u>NS</u> WGCSGKLICTTAVPWNASWS
	<u>Mutation 7</u> :	RYLKDQQLLGIWGCS <u>Q</u> KLICTTAVPWNASWS
	<u>Mutation 8</u> :	RYLKDQQLLGIWGCS <u>F</u> KLICTTAVPWNASWS
	<u>Mutation 9</u> :	RYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS <u>SS</u>
15	<u>Mutation 10</u> :	RYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAD <u>TL</u>
	<u>Mutation 11</u> :	RYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAT <u>NR</u>
	<u>Mutation 12</u> :	RYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAN <u>TR</u>
	<u>Mutation 13</u> :	RYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAN <u>TS</u>

20

Mutations au niveau de la zone 628-663

Zone 628-663	WNNMTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQ
<u>Mutation 1</u> :	WNNMTWMEWDREINNY <u>E</u> SLIHSLIEESQNQQEKNEQ
<u>Mutation 2</u> :	WNNMTWMEWDREINNYT <u>S</u> NIHSLIEESQNQQEKNEQ

- 32 -

TABLEAU 6

	Zone 651-673	EAIEKVTGALKINNRLRLVTLEHQ
5	Mutation 1	EAIEKVTRALKINNRLRLVTLEHQ
	Mutation 2	EAIEKVTDALKINNRLRLVTLEHQ
	Mutation 3	EAIEKVTAALKINNRLRLVTLEHQ
	Mutation 4	EAIEKVTOALKINNRLRLVTLEHQ
10	Zone 668-697	VTLEHQVLVIGLKVEAMEKFLYTAFAMQEL
	Mutation 1	VTLEHQVLVIGLKVEAMEAFLYTAFAMQEL
	Mutation 2	VTLEHQVLVIGLKVEAMENFLYTAFAMQEL
	Mutation 3	VTLEHQVLVIGLKVEAMEYFLYTAFAMQEL
15	Mutation 4	VTLEHQVLVIGLKVEAMERFLYTAFAMQEL
	Mutation 5	VTLEHQVLVIGLKVEAMEKFLKTAFAMQEL
	Mutation 6	VTLEHQVLVIGLKVEAMEKFL E TAFAMQEL
	Mutation 7	VTLEHQVLVIGLKVEAMEKFL O TAFAMQEL
	Mutation 8	VTLEHQVLVIGLKVEAMEKFL R TAFAMQEL
20	Mutation 9	VTLEHQVLVIGLKVEAMEKFL A TAFAMQEL
	Mutation 10	VTLEHQVLVIGLKVEAMEKFLYTAF Q MQEL
	Mutation 11	VTLEHQVLVIGLKVEAMEKFLYTAF K MQEL
	Mutation 12	VTLEHQVLVIGLKVEAMEKFLYTAF R MQEL
	Mutation 13	VTLEHQVLVIGLKVEAMEKFLYTAFAMQ I L
25	Mutation 14	VTLEHQVLVIGLKVEAMEKFLYTAFAMQ A L
	Mutation 15	VTLEHQVLVIGLKVEAMEKFLYTAFAMQ S L
	Mutation 16	VTLEHQVLVIGLKVEAMEKFLYTAFAMQ F L
30	Zone 686-718	KFLYTAFAMQELGCNQNQFFCKIPELWTRYNM
	Mutation 1	KFLYTAFAMQELGCNQN K FFCKIPELWTRYNM
	Mutation 2	KFLYTAFAMQELGCNQN R FFCKIPELWTRYNM
	Mutation 3	KFLYTAFAMQELGCNQN G FFCKIPELWTRYNM
35	Mutation 4	KFLYTAFAMQELGCNQN A FFCKIPELWTRYNM
	Mutation 5	KFLYTAFAMQELGCNQN L FCKIPELWTRYNM
	Mutation 6	KFLYTAFAMQELGCNQN H FCKIPELWTRYNM
	Mutation 7	KFLYTAFAMQELGCNQN I FCKIPELWTRYNM
	Mutation 8	KFLYTAFAMQELGCNQN A FCKIPELWTRYNM
40	Mutation 9	KFLYTAFAMQELGCNQN Q FCKIPELWTRYNM
	Mutation 10	KFLYTAFAMQELGCNQN R FCKIPELWTRYNM
45	Zone 727-762	WNHGNITLGEWYNQTKDLQQKFYEIIMDIEQNNVQGKT
	Mutation 1	WNHGNITLGEWYNQTKDL Q NKFYEIIMDIEQNNVQGKT
	Mutation 2	WNHGNITLGEWYNQTKDL Q HKFYEIIMDIEQNNVQGKT
	Mutation 3	WNHGNITLGEWYNQTKDL Q SKFYEIIMDIEQNNVQGKT
	Mutation 4	WNHGNITLGEWYNQTKDL Q AKFYEIIMDIEQNNVQGKT
50	Mutation 5	WNHGNITLGEWYNQTKDL Q GKFYEIIMDIEQNNVQGKT
	Mutation 6	WNHGNITLGEWYNQTKDL Q EKFYEIIMDIEQNNVQGKT

REVENDICATIONS

1. Procédé d'obtention d'un vaccin contre les effets pathogènes associés à l'infection d'un hôte, animal ou humain, par un rétrovirus capable de pénétrer dans une cellule cible dudit hôte, ladite cellule cible possédant un récepteur membranaire pour une protéine de l'hôte,

dans lequel on prépare un agent vaccinal à base d'un polypeptide comprenant au moins une partie d'une protéine d'enveloppe d'une souche pathogène dudit rétrovirus,

et dans lequel ledit polypeptide est préparé sous une forme modifiée,

étant entendu que :

- ladite partie de la protéine d'enveloppe est choisie parmi celles qui comprennent au moins un fragment d'une zone immunodominante de ladite protéine d'enveloppe, ledit fragment contenant au moins un acide aminé qui est un acide aminé conservé de ladite zone immunodominante et qui est présent dans ladite souche pathogène,
- ledit polypeptide, à l'état non modifié, induit une réponse immunitaire dirigée à la fois contre ladite zone immunodominante et contre la protéine de l'hôte,
- et ledit polypeptide modifié est choisi parmi ceux qui induisent une réponse immunitaire dirigée contre ladite zone immunodominante de la protéine d'enveloppe et non contre la protéine de l'hôte.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel ladite zone immunodominante est choisie :

- parmi celles qui donnent une réaction croisée, de type B et/ou de type T, avec ladite protéine de l'hôte, et/ou
- parmi celles pour lesquelles on a déterminé préalablement une analogie de structure tridimensionnelle avec une partie de ladite protéine de l'hôte.

3. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, présentant l'une au moins des caractéristiques suivantes :

- ladite protéine de l'hôte est un médiateur soluble;

-34-

- ledit médiateur soluble est choisi parmi les facteurs de croissance, les hormones protéiques et les cytokines ;
- ladite cytokine est l'interleukine-2, l'interleukine-10, l'interleukine-15, l'interleukine-8, ou une chemokine.

5 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, présentant l'une au moins des caractéristiques suivantes :

- 10 - ledit virus est choisi parmi les suivants: HIV, FIV, SIV, ALV, MULV, FELV, HTLV, STLV, BLV, virus du sarcome de Rous, virus Visna-maedi, virus du sarcome des félins, virus de la myelocytomatose aviaire, virus de la myeloblastose aviaire, les rétrovirus de type D des primates et les rétrovirus de type B inducteurs des tumeurs mammaires ;
- 15 - ladite protéine d'enveloppe est une glycoprotéine transmembranaire dudit rétrovirus;
- ladite glycoprotéine transmembranaire est celle d'un virus HIV, FIV ou SIV ;
- ladite glycoprotéine est la protéine gp41 de HIV1 ;
- 20 - ledit agent vaccinal contient, sous forme modifiée, un polypeptide comprenant au moins une partie de la zone 545-682 de la protéine gp41 de HIV1 ;
- ledit polypeptide modifié contient une mutation choisie parmi celles décrites au Tableau 5 ;
- 25 - ladite glycoprotéine est la protéine gp36 de FIV ;
- ledit polypeptide modifié contient une mutation choisie parmi celles décrites au Tableau 6.

30 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ledit polypeptide est sous la forme d'un oligomère d'au moins une partie d'une glycoprotéine transmembranaire dudit rétrovirus, ledit polypeptide étant à l'état modifié.

35 6. Composition vaccinale contenant un agent vaccinal pouvant être obtenu selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 5.

 7. Anticorps pouvant être obtenus par immunisation à l'aide d'une composition vaccinale selon la revendication 6,

-35-

lesdits anticorps reconnaissant ladite protéine d'enveloppe et non la protéine de l'hôte, et composition pharmaceutique contenant de tels anticorps.

8. Utilisation d'un polypeptide modifié pouvant être
5 obtenu par le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans la préparation d'une composition vaccinale destinée à prévenir les effets pathogènes associés à l'infection d'un hôte, animal ou humain, par un rétrovirus capable de pénétrer dans une cellule cible dudit hôte, ladite cellule cible possédant un
10 récepteur membranaire pour une protéine de l'hôte.

9. Polynucléotide codant pour un polypeptide modifié tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5, et vecteur d'expression contenant ledit polynucléotide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 98/02447

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K39/21 C12N15/48 C07K16/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOHNSON R P ET AL: "Identification of overlapping HLA class I-restricted cytotoxic T cell epitopes in a conserved region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: definition of minimum epitopes and analysis of the effects of sequence variation." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, (1992 APR 1) 175 (4) 961-71, XP002073647 see the whole document ---	1-9
A	WO 94 02505 A (DUKE UNIVERSITY) 3 February 1994 see the whole document ---	1-9
A	WO 94 06471 A (PITMAN-MOORE, INC.) 31 March 1994 see the whole document ---	1-9
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 April 1999

Date of mailing of the international search report

13/04/1999

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.

PCT/FR 98/02447

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 93 01304 A (SYNBIOTICS CORPORATION) 21 January 1993 see the whole document -----</p>	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02447

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9402505 A	03-02-1994	AU 688733 B	19-03-1998
		AU 4683793 A	14-02-1994
		EP 0652895 A	17-05-1995
		JP 8500342 T	16-01-1996
		NZ 254640 A	24-04-1997
		US 5656480 A	12-08-1997
WO 9406471 A	31-03-1994	AT 175119 T	15-01-1999
		AU 4826493 A	12-04-1994
		CA 2143187 A	31-03-1994
		DE 69322872 D	11-02-1999
		EP 0661999 A	12-07-1995
		JP 8504090 T	07-05-1996
		ZA 9306970 A	29-08-1994
WO 9301304 A	21-01-1993	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den .e Internationale No

PCT/FR 98/02447

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K39/21 C12N15/48 C07K16/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	JOHNSON R P ET AL: "Identification of overlapping HLA class I-restricted cytotoxic T cell epitopes in a conserved region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: definition of minimum epitopes and analysis of the effects of sequence variation." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, (1992 APR 1) 175 (4) 961-71, XP002073647 voir le document en entier ---	1-9
A	WO 94 02505 A (DUKE UNIVERSITY)- 3 février 1994 voir le document en entier ---	1-9
A	WO 94 06471 A (PITMAN-MOORE, INC.) 31 mars 1994 voir le document en entier ---	1-9

-/-

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 avril 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/04/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreau, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem a Internationale No

PCT/FR 98/02447

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 93 01304 A (SYNBIOTICS CORPORATION) 21 janvier 1993 voir le document en entier -----</p>	1-9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. e Internationale No

PCT/FR 98/02447

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9402505 A	03-02-1994	AU 688733 B	19-03-1998
		AU 4683793 A	14-02-1994
		EP 0652895 A	17-05-1995
		JP 8500342 T	16-01-1996
		NZ 254640 A	24-04-1997
		US 5656480 A	12-08-1997
WO 9406471 A	31-03-1994	AT 175119 T	15-01-1999
		AU 4826493 A	12-04-1994
		CA 2143187 A	31-03-1994
		DE 69322872 D	11-02-1999
		EP 0661999 A	12-07-1995
		JP 8504090 T	07-05-1996
WO 9301304 A	21-01-1993	ZA 9306970 A	29-08-1994
		AUCUN	